

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Eva Martínková

MOBILIZACE MARKERŮ ELEKTROOSMOTICKÉHO  
TOKU V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

Mobilization of electroosmotic flow markers in capillary  
electrophoresis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2015

Název: Mobilizace markerů elektroosmotického toku v kapilární elektroforéze

Řešitel: Eva Martínková

Ústav: Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta

Školitel: RNDr. Tomáš Křížek, PhD.

E-mail školitele: tomas.krizek@natur.cuni.cz

## **Abstrakt**

Kapilární zónová elektroforéza je separační metoda, která se využívá k separaci nabitých látek v elektrickém poli. Látky putují k detektoru díky vlastní elektroforetické mobilitě a elektroosmotickému toku v kapiláře. Separace probíhá na základě elektroforetické mobility látek, která je přímo úměrná náboji a nepřímo úměrná hydratovanému poloměru iontu. Z toho vyplývá, že neutrální látky tvoří při separaci jedinou zónu bez vzájemného rozlišení. Neutrální dobře absorbující látky tak lze využít jako markery průměrného elektroosmotického toku. Bylo však zjištěno, že některé markery mají tendenci se mobilizovat kladně či záporně vůči rychlosti elektroosmotického toku. Tato mobilizace je způsobena interakcemi markeru se složkami separačního pufru.

Cílem práce bylo proměřit mobilizace jednotlivých běžně používaných markerů EOF v kombinaci s různými kationty acetátového pufru a najít tak „ideální“ marker, jehož mobilita by se od skutečného EOF odlišovala jen minimálně, popřípadě najít kombinaci marker/pufr, které je lepší se při měření vyvarovat.

Bylo otestováno celkem 11 markerů a jim strukturně příbuzných látek v kombinaci se šesti kationty základního elektrolytu. Bylo zjištěno, že některé markery dosahují hodnotami své relativní mobility až pěti procent limitních mobilit malých anorganických kationtů. Z pohledu interakcí markeru s kationtem se jako ideální kombinace marker-pufr jeví methanol, akrylamid nebo thiomočovina s amonným iontem. Naopak nevhodná je kombinace mesityl oxidu se sodným iontem. Zároveň byl diskutován vliv struktury markeru i pufru na velikost relativní mobility.

**Klíčová slova:** Kapilární zónová elektroforéza, elektroosmotický tok, neutrální markery

Title: Mobilization of electroosmotic flow markers in capillary electrophoresis

Author: Eva Martínková

Department: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science

Supervisor: RNDr. Tomáš Křížek, PhD.

Supervisor's e-mail address: tomas.krizek@natur.cuni.cz

## **Abstract**

Capillary zone electrophoresis is a separation method used to separate charged substances in electric field. Substances migrate to detector due to their own electrophoretic mobility and electroosmotic flow in capillary. Separation is possible because of electroforetic mobility of substances, which is directly proportional to the charge and undirectly proportional to the hydrated radius of ion. This means that neutral molecules form just one neutral zone, which is detected together. Well absorbing neutral substances are thus used as markers of average (mean) EOF. It was found, that some of the markers have dispositions to be mobilized with respect to the EOF. This mobilization is caused by interactions of free electron pair on atoms of nitrogen or oxygen of marker with components of background buffer.

The aim of the study was to measure mobilization of some commonly used markers with different cations of acetate buffer and thus find „ideal“ marker, whose mobility is almost the same as EOF and find combinations of marker+buffer, which are better to be avoided.

Eleven markers in combination with six cations of background electrolyte were studied. We have found, that relative mobilities of some of chosen markers come up to five percent of limit mobilities of small inorganic cations. An appropriate combination of marker-buffer couple are methanol and acryl amide in acetate with ammonium ion. On the other hand, an inappropriate one is a combination of mesityl oxide in acetate with sodium ion. An effect of structure of both marker and buffer on relative mobilities was studied, too.

**Key words:** Capillary zone electrophoresis, electroosmotic flow, neutral markers

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. května 2015.

.....

Eva Martínková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, PhD. za neocenitelnou odbornou pomoc při tvorbě této práce. Další poděkování patří prof. RNDr. Pavlu Coufalovi, PhD., RNDr. Anně Kubíčkové, PhD., prof. RNDr. Pavlu Jungwirthovi, PhD. a RNDr. Janu Heydovi, PhD. za podnětné konzultace k odborné stránce práce. Bc. Vladimíru Palivcovi děkuji za simulace struktur markerů. Na závěr chci poděkovat rodině a přátelům za všechnu podporu, pomoc a motivaci, kterou mi během studia poskytli.

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>7</b>
<b>Seznam symbolů</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>10</b>
1.1 Kapilární zónová elektroforéza .....	10
1.1.1 Elektroforetická mobilita .....	10
1.1.2 Elektroosmotický tok .....	11
1.1.3 Měření elektroosmotického toku .....	14
1.2 Cíle .....	16
<b>2. Teoretická část</b> .....	<b>17</b>
2.1 Interakce markerů .....	17
2.2 Markery použité k měření .....	17
2.2.1 Krátké amidy .....	18
2.2.2 Skupina acetonu .....	19
2.2.3 Další strukturně nepodobné markery .....	20
<b>3. Experimentální část</b> .....	<b>21</b>
3.1 Chemikálie a instrumentace .....	21
3.2 Příprava základního elektrolytu, zásobních roztoků a vzorků .....	21
3.3 Způsob měření .....	22
<b>4. Výsledky a diskuze</b> .....	<b>24</b>
4.1 Vliv stérického bránění .....	27
4.2 Vliv velikosti kationtu .....	30
4.3 Vliv velikosti centrálního atomu markeru .....	31
4.4 TRIS .....	32
4.5 Draselný kationt .....	33
<b>5. Závěr</b> .....	<b>34</b>
<b>Použitá literatura</b> .....	<b>36</b>

## Seznam zkratek

AA – akrylamid

Ac - aceton

BGE – základní elektrolyt (background electrolyte)

CCD – charge-coupled device (zařízení s vázanými náboji, elektronická součástka určená ke snímání obrazu např. v digitální kameře)

CTAB – cetyltrimethylamonium bromid

CTAC – cetyltrimethylamonium chlorid

CZE – kapilární zónová elektroforéza

DAD – detektor diodového pole (diode array detector)

DMFA – N,N-dimethylformamid

DMSO - dimethylsulfoxid

EM – elektroforetická mobilita

EOF – elektroosmotický tok (electroosmotic flow)

EP – elektroforetická pohyblivost (mobilita)

FA - formamid

FTMA – (11-ferrocenylundecyl)trimethylammonium

LOO – mez pozorovatelnosti

MEO – mesityl oxid

MeOH - methanol

NMA – N-methylacetamid

NMFA – N-methylformamid

NMTU – N-methylthiomočovina

PVP – polyvinylpyrrolidon

SD – směrodatná odchylka (standard deviation)

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan

TTAOH – tetradecyltrimethylamonium hydroxid

TU - thiomočovina

UV-VIS – ultrafialová + viditelná část spektra elektromagnetického záření

VR – výsledná rychlost



## Seznam symbolů

$E$  – intenzita elektrického pole

$\varepsilon_0$  – permitivita vakua

$\varepsilon_r$  – relativní permitivita roztoku

$l_c$  – celková délka kapiláry

$l_d$  – délka kapiláry od vstupu k detektoru

$\mu$  – limitní elektroforetická mobilita

$\mu_{\text{EOF}}$  – elektroosmotická mobilita

$\mu_r$  – relativní mobilita markeru

$\eta$  – dynamická viskozita roztoku

$Q$  – náboj iontu

$r$  – hydratovaný poloměr iontu

$t_1$  – čas, při kterém prošla detektorem zóna markeru

$t_2, t_3$  – časy při kterých prošly detektorem obě zóny thiomočoviny

$t_U$  – doba, po kterou bylo napětí aplikováno

$U$  – napětí

$v$  – rychlost iontu v elektrickém poli

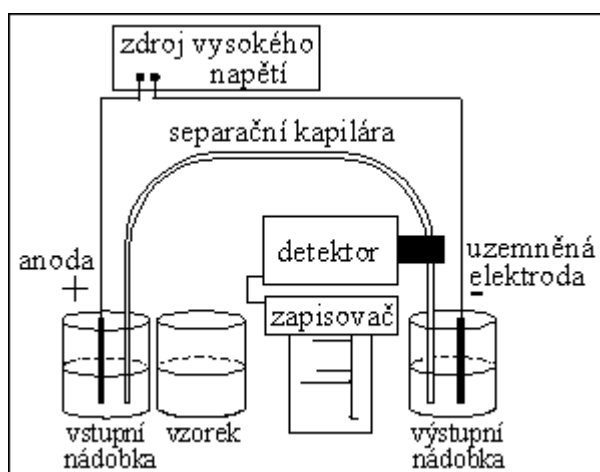
$v_{\text{EOF}}$  – rychlost elektroosmotického toku

$\zeta$  – zeta-potenciál

# 1. Úvod

## 1.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) patří do skupiny elektromigračních separačních metod. Stejně jako u dalších příbuzných metod (micelární elektrokinetická chromatografie, isotachoforéza) spočívá podstata kapilární zónové elektroforézy v migraci nabitých látek v elektrickém poli (Obr. 1.1). Migrace probíhá na základě dvou jevů – elektroforetické mobility látek a elektroosmotického toku (EOF).



Obr. 1.1 Schéma experimentálního uspořádání kapilární elektroforézy. Přejato a upraveno z [32].

### 1.1.1 Elektroforetická mobilita

Každá nabitá látka má vlastní elektroforetickou mobilitu, která je za daných podmínek konstantou. Je definována vztahem:

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{v}{E} \quad (1)$$

kde  $\mu_{\text{EOF}}$  je elektroforetická mobilita,  $v$  je rychlost iontu v elektrickém poli a  $E$  je intenzita elektrického pole. Z uvedeného vztahu vyplývá, že pokud má látka vlastní elektroforetickou mobilitu, pohybuje se v elektrickém poli. Velikost rychlosti je rovna

součinu intenzity daného elektrického pole a elektroforetické mobility iontu, její vektor směřuje ke katodě v případě kationtů a k anodě v případě aniontů.

Podle jiného vztahu je mobilita přímo úměrná náboji látky a nepřímo úměrná velikosti hydratovaného poloměru iontu:

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{Q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

kde  $Q$  je náboj iontu,  $\eta$  je dynamická viskozita roztoku a  $r$  hydratovaný poloměr iontu.

Ve vodných roztocích pro jednotlivé skupiny v periodické tabulce platí, že iont má tím větší hydratovaný poloměr, čím je menší [1]. Pro stejně nabitě ionty prvků tak platí pravidlo, že jejich mobilita stoupá ve skupinách a klesá v periodách. Vzhledem k faktu, že elektroforetická mobilita a tedy i rychlost iontu jsou závislé na velikostech náboje a hydratovaného poloměru iontu, je možné vzájemně separovat různě velké kladné nebo záporné ionty. U složitějších látek záleží také na prostorovém uspořádání atomů v molekule, což umožňuje dělit například stereoisomery [2,3].

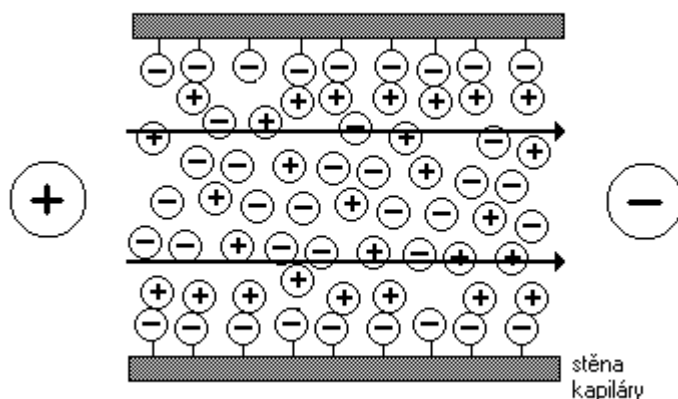
### 1.1.2 Elektroosmotický tok

Elektroforetická separace většinou probíhá v křemenné kapiláře, na jejímž povrchu se nacházejí volné silanolové skupiny. Tyto skupiny pak v závislosti na pH základního elektrolytu (BGE) do různé míry disociují, čímž stěna kapiláry získává záporný náboj [4,5]. Na takto záporně nabitou stěnu kapiláry se naadsorbuje vrstva kladně nabitých iontů z roztoku, čímž dojde k vytvoření elektrické dvojvrstvy. Tato první vnější vrstva se nazývá Sternova a na jejím povrchu dochází ke vzniku Sternova potenciálu. Na Sternovu vrstvu je pak navázaná část difuzní vrstvy. Na rozhraní statické a volně se pohybující difuzní vrstvy vzniká zeta-potenciál (elektrokinetický potenciál,  $\zeta$ -potenciál), jehož hodnotu lze získat s využitím následujícího vztahu [6]:

$$\zeta = \frac{4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot \mu_{\text{EOF}}}{\varepsilon_r} \quad (3)$$

kde  $\eta$  je dynamická viskozita roztoku,  $\varepsilon_r$  jeho relativní permitivita a  $\mu_{\text{EOF}}$  je mobilita elektroosmotického toku.

Pokud se na takový systém aplikuje stejnosměrné elektrické napětí, začne difuzní vrstva díky přítomnému zeta-potenciálu migrovat směrem ke katodě a díky viskozitě s sebou strhává veškerý roztok přítomný v kapiláře (Obr. 1.2), což se nazývá elektroosmotický tok.



**Obr. 1.2 Vznik elektroosmotického toku. Přejato z [31].**

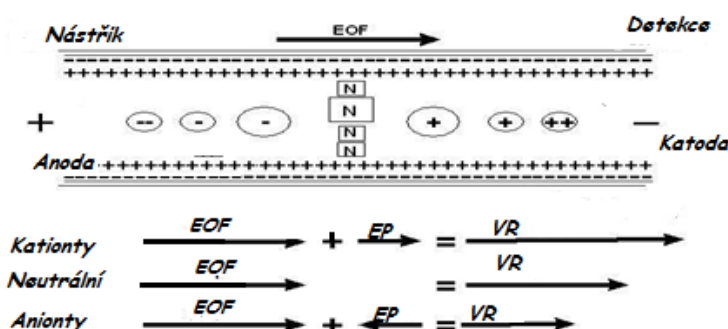
Rychlost elektroosmotického toku  $v_{\text{EOF}}$  je dána von Smoluchowského rovnicí:

$$v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} \cdot E = \frac{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta}{\eta} \cdot E \quad (4)$$

kde  $\varepsilon_r$  je relativní permitivita rozpouštědla,  $\varepsilon_0$  je permitivita vakua,  $\zeta$  je zeta-potenciál,  $\eta$  je dynamická viskozita rozpouštědla a  $E$  je intenzita elektrického pole.

Tloušťka elektrické dvojvrstvy pro vodné roztoky binárních elektrolytů o koncentraci  $10^{-2}$  -  $10^{-6}$  mol/l je 30-300 nm. To je o několik řádů méně, než je vnitřní průměr běžně používaných kapilár, který činí většinou 50 až 100  $\mu\text{m}$ . Tloušťka této vrstvy je tak oproti vnitřnímu průměru kapiláry zanedbatelná, což de facto znamená, že se elektroosmotický tok projevuje v celém průřezu kapiláry a jeho rychlostní profil je díky tomu lineární, takže téměř nepřispívá k rozmývání zón jednotlivých píků. Toto pravidlo platí, pokud je vnitřní průměr kapiláry alespoň sedmkrát větší než tloušťka elektrické dvojvrstvy. Vzhledem k tomu, že elektroosmotický tok přímo určuje dobu separace, závisí na něm také rozlišení jednotlivých zón a účinnost separace. V případě špatného rozlišení je možné pracovat s intenzitou aplikovaného elektrického pole či dynamickou viskozitou rozpouštědla, což vyplývá z výše uvedených rovnic [6].

Jak již bylo řečeno, rychlost elektroosmotického toku závisí na míře disociace silanolových skupin a tím i na pH základního elektrolytu. Mezi hodnotami pH 3-8 rychlost EOF několikanásobně stoupá a převyšuje hodnoty vlastních elektroforetických mobilit i malých (rychlých) iontů [7]. Díky tomu ke katodě migrují kationty rychlostí, která se rovná součtu rychlosti EOF a elektroforetické rychlosti, i anionty, jejichž rychlost se rovná rozdílu rychlosti EOF a elektroforetické rychlosti (Obr. 1.3). Neutrální látky by se měly pohybovat pouze rychlostí elektroosmotického toku. Elektroosmotický tok je tak výhodou kapilární elektroforézy, díky jeho přítomnosti je možné stanovit kationty i anionty během jedné analýzy. Výjimku v tomto případě mohou tvořit velmi malé anorganické ionty, jejichž elektroforetická rychlost je zpravidla vyšší než rychlost EOF a v jejich případě tak převládne pohyb směrem k anodě. V takovém případě musí dojít k potlačení, popřípadě otočení elektroosmotického toku pomocí vhodných činidel.



**Obr. 1.3** Ovlivnění rychlosti iontů elektroosmotickým tokem. EOF je elektroosmotický tok, EP je elektroforetická pohyblivost a VR výsledná rychlost migrující částice. Přejato a upraveno z [30]

Jednou skupinou takových činidel jsou kationtové tenzidy, organické kationty s dlouhým alifatickým řetězcem, které se navážou na záporně nabitou stěnu kapiláry. Na hydrofobní alifatické řetězce orientované dovnitř kapiláry se naváže další vrstva tenzidů, čímž v podstatě dojde k převrácení znaménka na stěně kapiláry a otočení směru elektroosmotického toku. Mezi běžně používané kationtové tenzidy patří cetyltrimethylamonium chlorid (CTAC) [8,9], cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) [10] nebo tetradecyltrimethylamonium hydroxid (TTAOH) [11].

Dočasně lze velikost a směr elektroosmotického toku kontrolovat také pokrytím vnitřních stěn kapiláry přidávkem redoxního surfaktantu, který se po aplikaci elektrického pole začne oxidovat, čímž se mění potenciál na povrchu kapiláry. Takovou látkou je například (11-ferrocenylundecyl)trimethylammonium bromide (FTMA) [12].

Elektroosmotický tok potlačuje přidavek některých polymerů, Milanova a kol. použili polyvinylpyrrolidon (PVP) a studovali vliv změn jeho koncentrace na elektroforetické mobility fluorescenčních barviv [13].

### 1.1.3 Měření elektroosmotického toku

Elektroosmotický tok a jeho kontrola hrají při elektroforetických separacích velkou roli. Přesné experimentální hodnoty jeho rychlosti je výhodné znát například při výpočtu různých fyzikálně-chemických konstant [14]. Korekci na hodnotu elektroosmotického toku je třeba aplikovat například i při měření efektivních elektroforetických mobilit látek. Existuje několik možností, jak hodnoty rychlosti získat.

Zřejmě nejčastěji používanou metodou je přidavek neutrálního markeru k analytu. Jak již bylo řečeno výše, neutrální látky by se měly pohybovat rychlostí EOF a není tak příliš složité tuto hodnotu vypočítat z migračního času markeru. Tato metoda je rychlá, nenáročná a levná. Jediný požadavek je použití látky, která se dá dobře detekovat způsobem používaným pro celou metodu, což je nejčastěji UV-VIS detekce, ačkoli například vodivostní detektor či detekce online propojením s hmotnostním spektrometrem jsou také poměrně časté [13,15]. Nevýhodou neutrálních markerů je, že nereflektují okamžité změny rychlosti elektroosmotického toku v průběhu měření, ke kterým dochází vlivem změn na nestabilním povrchu kapiláry, ale poskytují pouze její průměrnou hodnotu až do průchodu markeru detektorem. Jakékoli změny v systému, ke kterým došlo po průchodu markeru detektorem, nejsou zaznamenány vůbec [15,16]. Neutrální markery také nejsou vhodné k měření nízkých a zbytkových hodnot EOF, jelikož doba potřebná k průchodu markeru detektorem by dosáhla i několika hodin.

Posledně jmenovanou nevýhodu se pokusili odstranit Righetti a kol., kteří ve své práci navrhují metodu právě pro tento případ. Jejich způsob spočívá v elektrokinetickém nadávkování markeru a jeho následné mobilizaci použitím nízkého tlaku. Pokud je marker neutrální, je rychlost elektrokinetického dávkování rovna rychlosti elektroosmotického toku. Výsledný pík je poté kvantifikován a hodnota elektroosmotického toku je odhadnuta podle množství nastříknutého vzorku [17].

Nepříliš používanou metodou je měření změny hladiny ve výstupní vialce, popřípadě vážení přírůstku elektrolytu, který domigroval do výstupní vialky. Tento způsob opět nezohledňuje okamžité změny v systému [18].

Místo neutrálních markerů se dají použít barviva, jejichž detekce probíhá zobrazováním výtoku z kapiláry pod mikroskopem a s využitím CCD kamery [19,20]. Fluorescenční barviva se dají použít i pro měření EOF v reálném čase. Lee a kol. vyvinuli metodu, při které na výstupní konec kapiláry připojí celou, ve které se kapalina vytékající ze separační kapiláry mísí s barvivem a další napojenou kapilárou teče k fluorescenčnímu detektoru. Tato metoda dokáže reflektovat okamžité změny EOF menší než 1 % a časový úsek, za který se změna projeví, je přibližně 1 s [21].

Měření rychlosti elektroosmotického toku v bezvodé kapilární elektroforéze je možné pomocí tepelně aktivovaného značení. Tato značení jsou v podstatě drobné poruchy v základním elektrolytu vyvolané tepelnou změnou z rozžhavené žárovky, které se posléze detekují pomocí CCD kamery. Metoda má navíc výbornou reprodukovatelnost ( $RSD < 0,5 \%$  pro 4 -7 opakování).

## 1.2 Cíle

Vzhledem k tomu, že z hodnot elektroosmotického toku se počítají různé fyzikálněchemické konstanty, vedou nepřesná měření k nepřesným výsledkům těchto konstant a tím můžou způsobovat další chyby v teoretických výpočtech.

V průběhu práce budou proměřeny relativní mobility nejčastěji používaných markerů elektroosmotického toku v acetátovém pufru s různými běžně používanými kationty. Dále budou proměřeny relativní mobility látek strukturně blízkých markerům, aby bylo možné monitorovat trendy ve změnách relativních mobilit vzhledem ke struktuře markeru. Hlavním cílem práce je sledování různých vlivů na hodnoty relativních mobilit a vysvětlení možných mechanismů interakcí mezi markery a kationty.

Díky známým hodnotám relativních mobilit různých markerů bude možné vybrat dvojice pufr – marker, kde je odchylka nejnižší nebo vůbec žádná, což bude mít pozitivní vliv na přesnost fyzikálněchemických výpočtů. Práce zároveň ukáže, jakým kombinacím marker – pufr je lepší se v praxi vyhnout.



## **2. Teoretická část**

### **2.1 Interakce markerů**

Experimentální data ukázala, že ne vždy se neutrální marker pohybuje skutečně rychlostí EOF, protože dochází k vzájemným interakcím mezi markerem a složkami základního elektrolytu. Markery jsou organické nedisociující látky, které často ve svých molekulách obsahují silně elektronegativní prvky (kyslík, síru), na kterých jsou přítomny volné elektronové páry. Přítomnost těchto prvků spolu s alkylovými a složitějšími nepolárními skupinami způsobuje vysokou diferenciaci náboje na povrchu molekuly markeru. Díky tomu může docházet k interakcím typu iont – dipól mezi molekulami markeru a základního elektrolytu. Jako základní elektrolyt byl v této práci použit acetátový aniont v kombinaci s různými kationty. Dle Hofmeisterovy řady je acetát tvrdý aniont, dobře se tedy váže na ta místa markeru, kde může tvořit vodíkové vazby. Naopak je silně vypuzován z hydrofobních částí molekuly. Všechny použité kationty s výjimkou TRIS jsou rovněž kationty tvrdé, takže se dobře vážou na vazebná místa typu karbonylu nebo sulfinylu. Z hydrofobních částí povrchu jsou pravděpodobně vypuzovány ještě více než acetát [22]. Tyto vlastnosti se ve výsledné interakci sčítají a jejich vlivem dochází k mobilizaci markeru oproti rychlosti elektroosmotického toku v kladném nebo záporném směru. Velikost mobilizace závisí na více faktorech, které budou podrobně diskutovány níže.

### **2.2 Markery použité k měření**

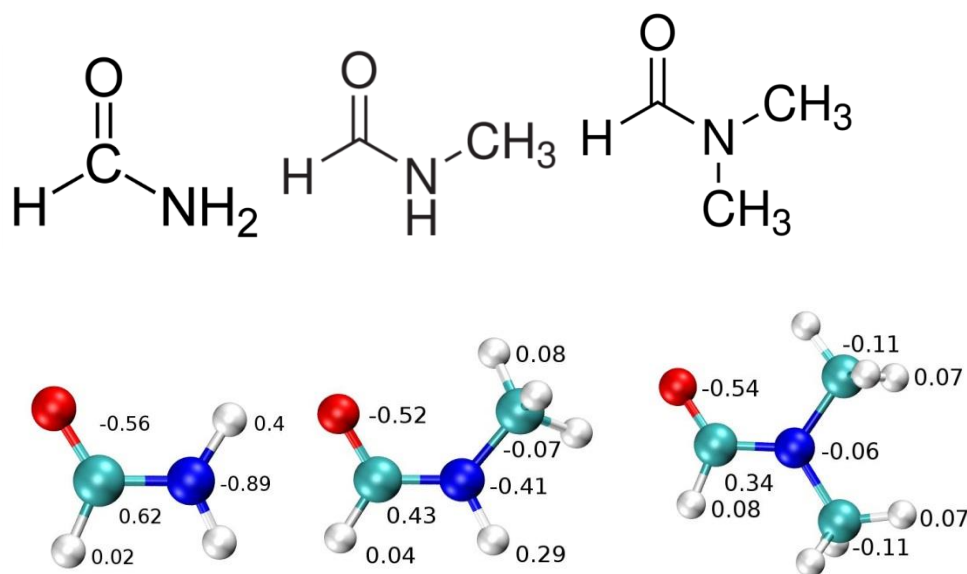
K měření byly vybrány obvykle využívané markery, které byly pro srovnání (např. kvůli vlivu drobných změn struktury) doplněny dalšími méně využívanými. Jedna z podmínek byla, že markery musí absorbovat UV záření, protože UV-VIS detekce je stále nejčastěji využívaná.

Z principu metody vyplývá, že není možné měřit přímo mobility jednotlivých markerů, ale pouze jejich relativní hodnoty ve vztahu k nějakému referentnímu markeru. Za referentní marker byla vybrána thiomočovina, jelikož se předpokládá její

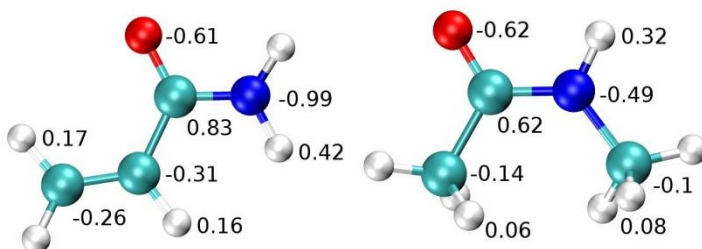
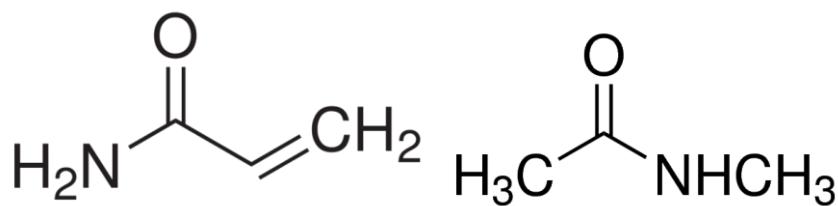
nízká interakce se základním elektrolytem, což bylo v průběhu práce potvrzeno i experimentálně. Je to také vedle DMSO jeden z nejfrekventovanějších markerů. Vztah použitý pro výpočet relativních mobilit jednotlivých markerů umožňuje přepočet hodnot na kterýkoli jiný marker. Použité markery byly pracovně rozděleny do tří strukturně podobných skupin.

### 2.2.1 Krátké amidy

První skupinu tvoří krátké amidy formamid, N-methylformamid, N,N-dimethylformamid, N-methylacetamid a akrylamid. První tři byly vybrány kvůli studiu vlivu methylace na velikost relativní mobility markeru. Akrylamid byl přidán pro změření vlivu záměny vodíku za složitější organickou skupinu. N-methylacetamid byl první marker původně použitý jako model peptidické vazby [23]. Struktury markerů jsou zobrazeny na Obr. 2.1 a Obr. 2.2.



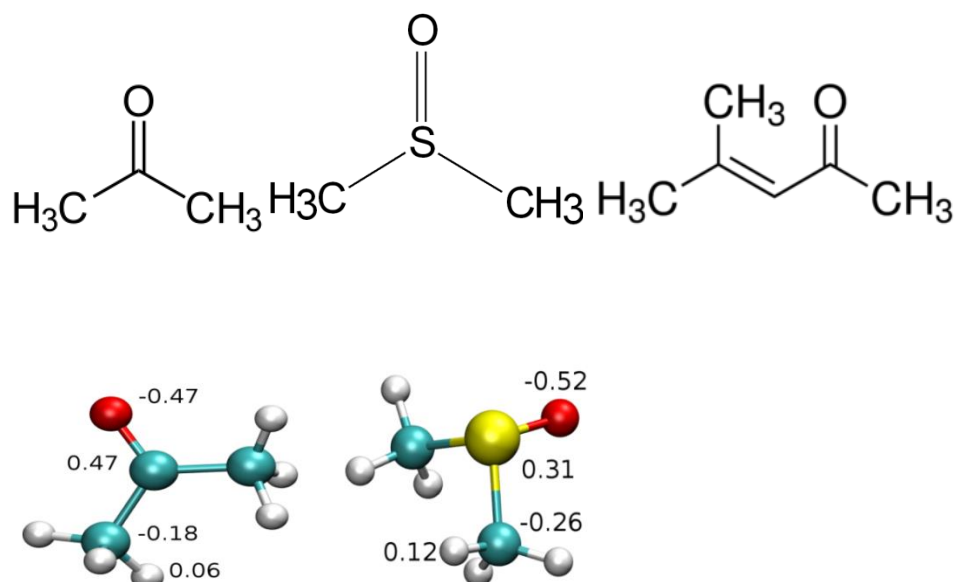
**Obr. 2.1** Struktury markerů amidů kyseliny mravenčí a rozložení parciálního náboje na jejich molekulách. Červeně jsou vyznačeny atomy kyslíku, tmavě modře atomy dusíku, světle modře atomy uhlíku a bílé atomy vodíku. Markery jsou seřazeny v pořadí formamid – N-methylformamid, N,N-dimethylformamid. Grafy rozložení parciálního náboje použity se svolením Bc. Vladimíra Palivce, VŠCHT.



**Obr. 2.2** Struktury markerů ostatních krátkých amidů a rozložení parciálního náboje na jejich molekulách. Červeně jsou vyznačeny atomy kyslíku, tmavě modře atomy dusíku, světle modře atomy uhlíku a bílé atomy vodíku. Markery jsou seřazeny v pořadí akrylamid a N-methylacetamid. Grafy rozložení parciálního náboje použity se svolením Bc. Vladimíra Palivce, VŠCHT.

## 2.2.2 Skupina acetonu

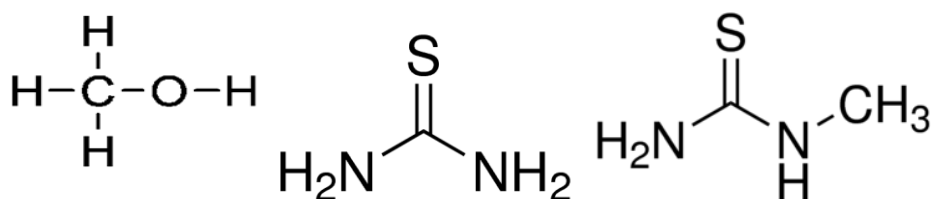
Do druhé skupiny jsou zahrnuty látky strukturně podobné acetonu. Kromě samotného acetonu sem patří ještě dimethylsulfoxid a mesityloxid. V prvním případě je studován vliv záměny centrálního uhlíku za síru, která je díky rozdílné velikosti obou atomů spojená se změnou rozvrstvení parciálního náboje na povrchu molekuly. Mesityloxid má opět dokumentovat záměnu jednoduché methylové skupiny za složitější (isobutenovou), což má za následek změnu rozvrstvení náboje, změnu poměru polární a nepolární části molekuly a také vyšší stericke bránění pro přístup k molekule. Struktury markerů jsou zobrazeny na Obr. 2.3.



**Obr. 2.3** Struktury markerů druhé skupiny a rozložení parciálního náboje na jejich molekulách. Červeně jsou vyznačeny atomy kyslíku, světle modře atomy uhlíku, žlutě atomy síry a bíle atomy vodíku. Markery jsou řazeny v pořadí aceton – dimethylsulfoxid – mesityl oxid. Grafy rozložení parciálního náboje použity se svolením Bc. Vladimíra Palivce, VŠCHT.

### 2.2.3 Další strukturně nepodobné markery

V poslední skupině je methanol, jelikož se jedná o poměrně často používaný marker, navíc je to jednoduchá organická látka strukturně blízká vodě. Druhým markerem ve skupině je N-methylthiomočovina, která má dokumentovat vliv methylace dusíkového atomu thiomočoviny na její chování. Třetím markerem je samotná thiomočovina. Struktury markerů 3. skupiny jsou uvedeny na Obr. 2.4.



**Obr. 2.4** Struktury markerů třetí skupiny. Markery jsou řazeny v pořadí methanol – thimočovina – N-methylthiomočovina.

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Chemikálie a instrumentace

Jako základní elektrolyt byl použit acetátový pufr s příslušným kationtem. Kyselina octová 99% p. a. ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), hydroxid amonný 24% p. a. ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), hydroxid vápenatý ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) a hydroxid hořečnatý ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) pocházejí z firmy Lach Ner, Neratovice ČR. Hydroxid lithný p. a. ( $\text{LiOH}$ ) a TRIS p. a. byly dodány firmou Sigma Aldrich, St. Louis, USA. Hydroxid sodný p. a. ( $\text{NaOH}$ ) je od firmy Penta, ČR.

Jako markery byly použity produkty firmy Lach Ner, Neratovice, ČR (formamid p. a. (FA), N-methylformamid p. a. (NMFA), N,N-dimethylformamid p. a. (DMFA), aceton p. a. (Ac), methanol p. a. (MeOH), mesityloxid p. a. (MEO), akrylamid p. a. (AA), dimethylsulfoxid p. a. (DMSO), thiomocovina p. a. (TU)) a firmy Sigma Aldrich s. r. o., St. Louis, USA (N-methylacetamid p. a. (NMA), N-methylthiomocovina p. a. (NMTU)).

Měření byla prováděna na elektroforetickém systému Capillary Electrophoresis 7100, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo. Měření probíhalo v nepokryté křemenné kapiláře od firmy Caco Slovakia, Bratislava, SR, o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$  a celkové délce 80 cm, resp. 71,5 cm od vstupního konce k detektoru. Bylo použito hydrodynamické dávkování vzorku tlakem o velikosti 5 kPa po dobu 5 s. K detekci byl použit DAD UV detektor, měřeny byly absorbance při vlnových délkách 200 nm, 214 nm a 254 nm. K měření pH elektrolytů byl používán 3540 pH & Conductivity meter od firmy Jenway, Staffordshire, Velká Británie se skleněnou pH elektrodou od téhož výrobce.

#### 3.2 Příprava základního elektrolytu, zásobních roztoků a vzorků

Potřebná koncentrace acetátového aniontu a pH elektrolytu bylo vypočteno pomocí programu PeakMaster [24]. Měření bylo prováděno při konstantní iontové síle elektrolytu 250 mM a pH 4,5. Acetátový pufr byl tak použit v koncentraci 600 mM pro jednomocné a 400 mM pro dvoumocné kationty. Zásobní roztok byl v těchto dvou koncentracích připraven přímým smísením požadovaného množství 99% kyseliny

octové a deionizované vody. Zásobní roztok byl poté titrován buď příslušným koncentrovaným vodným roztokem dobře rozpustného hydroxidu (10M NaOH; 24% NH<sub>4</sub>OH), popřípadě přidavkem pevného málo rozpustného hydroxidu (LiOH, Mg(OH)<sub>2</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>) nebo TRIS, dokud nebylo dosaženo požadované hodnoty pH, která byla sledována pH-metrem.

Zásobní roztoky markerů byly připraveny zředěním kapalného markeru v poměru 1/500 deionizovanou vodou. V případě pevných markerů byly připraveny roztoky o koncentraci 1 g/l.

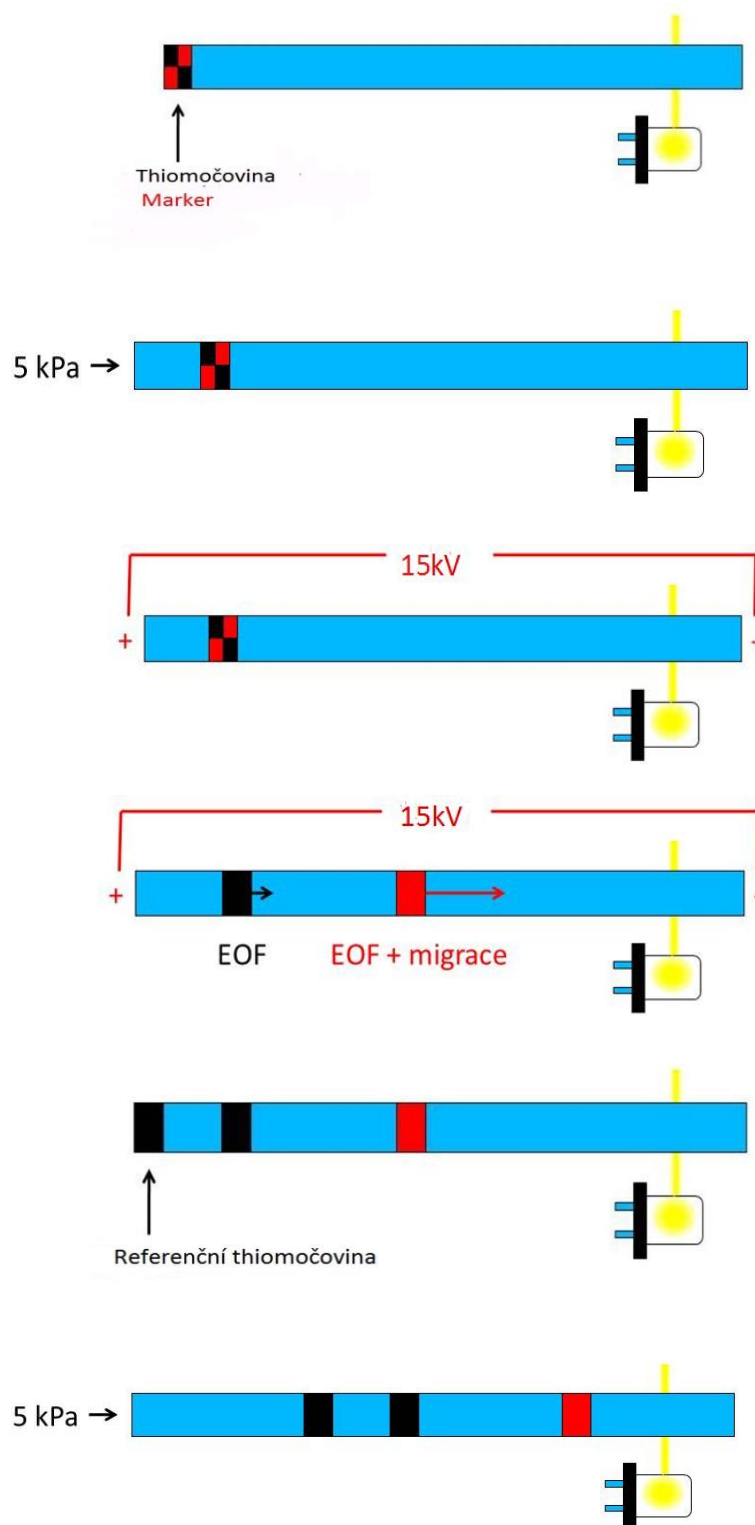
Vzorek byl připraven dalším zředěním zásobního roztoku markeru acetátovým pufrům s příslušným kationtem a sestával ze směsi zkoumaného markeru a thiomocoviny. Poměr ředění byl 1/9 pro thiomocovinu a 1/9 – 3/7 pro marker. Metoda standardního přidavku byla použita pro lepší identifikaci píku markeru.

### 3.3 Způsob měření

Pro měření byla použita na katedře upravená metoda dle Vigha [25]. Kapilára byla nejprve promyta pět minut 1M NaOH, poté tři minuty deionizovanou vodou a dvě minuty základním elektrolytem. Poté byl hydrodynamicky nadávkován vzorek. Celý systém byl následně hodinu mobilizován napětím 15 kV. Během této doby byly v 15 minutových intervalech měněny vialky se základním elektrolytem, aby nedocházelo k významným změnám prostředí způsobeným elektrolýzou. Následně byl do systému nastříknut referenční vzorek thiomocoviny a celý systém byl mobilizován tlakem 5 kPa po dobu 25 minut, dokud všechny tři požadované zóny (markeru a obou thiomocovin) neprošly detektorem. Celý proces je naznačen na obr. 3.1. Výsledná relativní mobilita markeru  $\mu_r$  byla vypočtena podle vztahu [26]:

$$\mu_r = \frac{(t_2 - t_1)l_d l_c}{t_3 t_U U} \quad (5)$$

kde  $t_1$  je čas, při kterém prošla detektorem zóna markeru,  $t_2$  a  $t_3$  jsou tytéž časy pro obě zóny thiomocoviny,  $l_c$  je celková délka kapiláry,  $l_d$  je délka kapiláry od vstupu k detektoru,  $U$  je aplikované napětí a  $t_U$  doba, po kterou bylo napětí aplikováno.



Obr. 3.1 Schematické znázornění způsobu měření relativních mobilit markerů upravenou metodou dle Vigha.

## 4. Výsledky a diskuze

Výsledná velikost interakce mezi markerem a pufrům je součtem vlivů kationtu a aniontu pufru. V této práci byl vliv aniontu (acetátu) konstantní a následující závěry jsou vyvozené pro dvojice kationt-marker.

Měření ukázala, že se relativní mobility různých neutrálních markerů mezi sebou poměrně výrazně liší. Hodnoty relativních mobilit se pohybují v řádu od  $10^{-9}$  do  $10^{-10}$   $\text{m}^2/\text{Vs}$ . Princip měření probíhá na základě separace dvou neutrálních markerů elektroosmotického toku v elektrickém poli způsobené různou mírou interakce těchto markerů se složkami základního elektrolytu. Limity metody jsou závislé na minimální hodnotě rozlišení píků měřených markerů. Danou metodou je možné experimentálně získat relativní mobility do hodnoty přibližně  $1 \cdot 10^{-11}$   $\text{m}^2/\text{Vs}$ . V Tab. 4.1 jsou přehledně shrnuté hodnoty relativních mobilit všech měřených kombinací markerů a kationtů v acetátovém pufru. Výsledky jsou uspořádány podle výše definovaných pracovních skupin markerů.

**Tab. 4.1 Naměřené hodnoty relativních mobilit pro všechny kombinace markerů a kationtů. Všechny hodnoty jsou vztažené na thiomocovinu jako relativní marker. Pro kombinace markerů a kationtů označené <LOO byly hodnoty relativních mobilit neměřitelné.**

$\mu_r \pm \text{SD} \cdot 10^{10} [\text{m}^2/\text{Vs}]$						
Marker Kationt	$\text{Li}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{NH}_4^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	TRIS
FA	8,14±0,05	7,28±0,31	4,28±0,13	7,49±0,13	7,79±0,10	<LOO
MFA	3,35±0,06	3,14±0,08	1,72±0,09	5,70±0,05	5,45±0,07	<LOO
DMFA	2,66±0,01	2,28±0,03	1,42±0,11	5,34±0,15	4,52±0,01	<LOO
AA	3,90±0,17	1,53±0,05	<LOO	2,84±0,04	3,27±0,03	<LOO
NMA	3,56±0,02	<LOO	<LOO	-	2,40±0,01	-1,77±0,27
Ac	1,65±0,04	2,09±0,03	1,57±0,29	1,45±0,11	1,33±0,02	<LOO
MEO	1,79±0,02	10,10±0,20	1,69±0,14	1,37±0,02	3,20±0,03	<LOO
DMSO	6,26±0,05	2,79±0,04	1,58±0,16	5,38±0,14	4,24±0,10	<LOO
MeOH	1,45±0,02	2,27±0,02	0,43±0,04	1,22±0,14	2,15±0,39	<LOO
NMTU	<LOO	<LOO	<LOO	<LOO	<LOO	<LOO

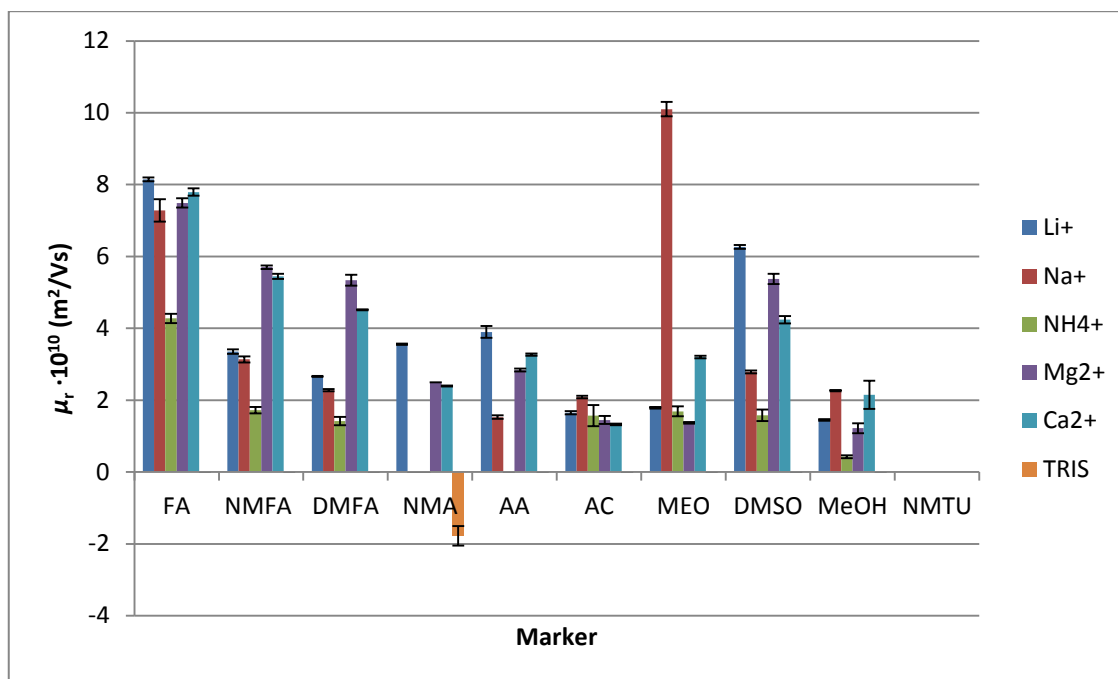


Pro větší přehlednost jsou získaná data interpretována ve dvou grafech – v závislosti na markeru a v závislosti na kationtu (Obr. 4.1 a Obr. 4.2). Z grafů jsou patrné následující trendy. Všeobecně vysoké hodnoty relativních mobilit vykazují formamid a dimethylsulfoxid. Nejvyšší z těchto hodnot – relativní mobilita mesityl oxidu v sodném pufru - dosahuje dokonce až pěti procent hodnot mobilit malých anorganických iontů a pro větší a tím pádem pomalejší ionty hodnot ještě vyšších (Tab. 4.2). Jedná se přitom o poměrně běžný marker. Tak vysoká chyba stanovení EOF může mít na další výsledky již velký vliv.

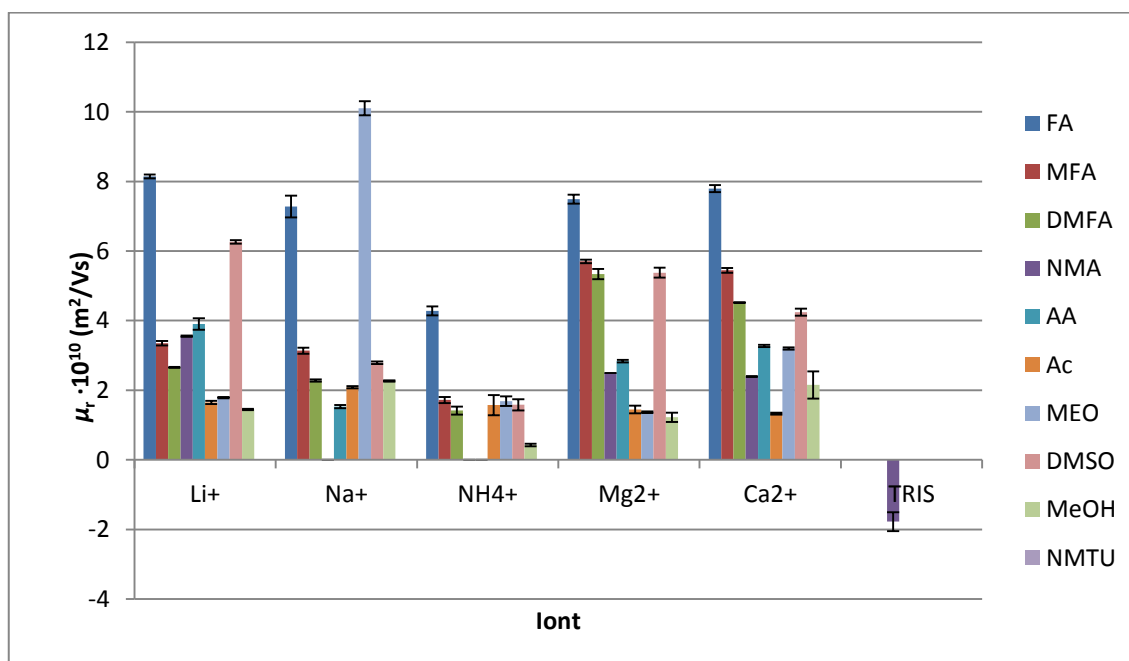
**Tab. 4.2 Hodnoty iontových mobilit ve vodě při 298 K [28]**

<b>Iont</b>	<b><math>\mu \cdot 10^{10} [\text{m}^2/\text{sV}]</math></b>
<b>Li<sup>+</sup></b>	401
<b>Na<sup>+</sup></b>	519
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	763
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	617
<b>H<sup>+</sup></b>	3623
<b>CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup></b>	424

Naopak nejnižší hodnoty relativních mobilit poskytly experimenty pro N-methylacetamid a N-methylthiomocovinu. Uspokojivá jsou též data pro methanol a aceton. V případě kationtů nelze jednoznačně určit, který interaguje nejméně nebo nejvíce, záleží vždy na kombinaci s konkrétním markerem. Nejnižší hodnoty relativních mobilit mají markery (s výjimkou formamidu) v amonném pufru. V tomto pufru však dochází k poměrně výraznému zvýšení šumu na základní linii, což by nebylo příliš vhodné pro stanovení s nízkými limity detekce a kvantifikace, pokud by tento nedostatek přetrvával i za běžných experimentálních podmínek. Až na jednu výjimku (N-methylacetamid) měly všechny markery neměřitelné relativní mobility v přítomnosti TRIS, což může být způsobeno strukturou naprosto odlišnou od ostatních kationtů. Rozdílné vlivy na velikost relativních mobilit jsou diskutovány níže.



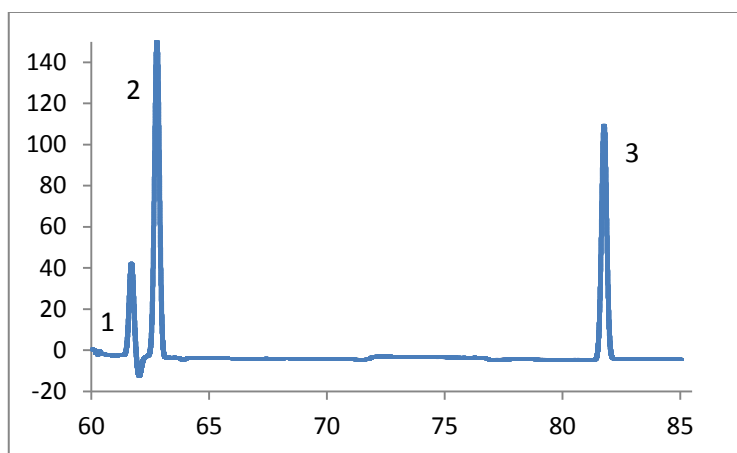
**Obr. 4.1** Hodnoty relativních mobilit jednotlivých markerů seřazených do pracovních skupin. Všechny hodnoty jsou získané s použitím thiomochoviny jako referenčního markeru.



**Obr. 4.2** Hodnoty relativních mobilit jednotlivých markerů v závislosti na použitém kationtu acetátového pufru. Kationty jsou (s výjimkou TRIS) řazeny podle klesajícího hydratovaného poloměru. Všechny hodnoty byly získány s použitím thiomochoviny jako referenčního markeru.

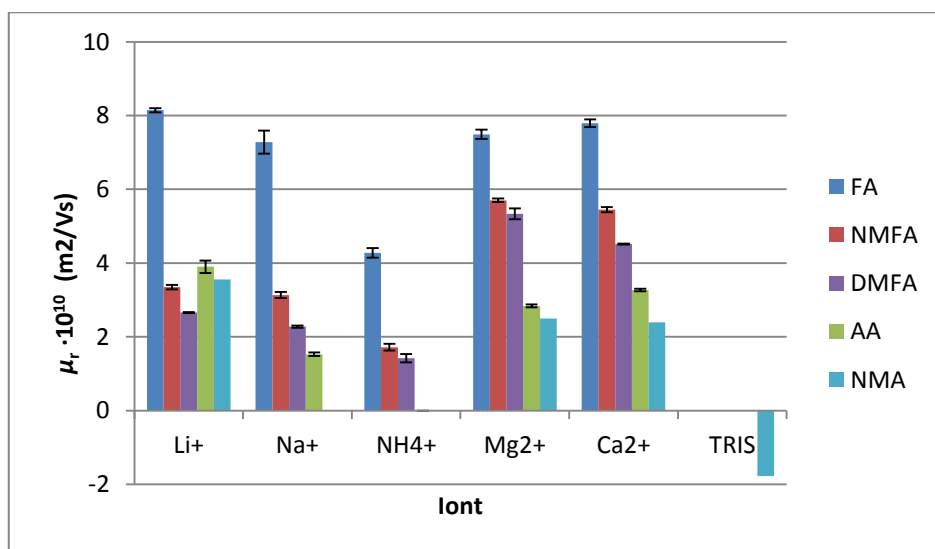
## 4.1 Vliv stérického bránění

K interakcím dipól-iont mezi markerem a kationtem dochází na tom atomu markeru, který nese vysoký parciální záporný náboj. K nejlepší interakci dochází, pokud je vazebné místo dobře přístupné kationtu. V případě přítomnosti větších skupin však může docházet ke stérickému bránění vazebného místa a výsledný efekt na relativní mobilitu markeru tak může být nižší než v případě, kdy k bránění nedochází. Tento fakt je nejvíce patrný ve skupině krátkých amidů, kde v pořadí formamid – N-methylformamid – N,N-dimethylformamid dochází ke zvyšující se methylaci amidového dusíku a zároveň relativní mobility v tomto pořadí klesají (elektroferogram pro N,N-dimethylformamid je na Obr. 4.3). K interakci mezi kationtem a markerem zde dochází na atomu kyslíku, který má dva volné elektronové páry a vysoký záporný parciální náboj a zároveň je díky geometrii molekuly pro přístup kationtu dobře přístupný. Větší methylové skupiny stéricky brání centrum interakce kationtu na atomu kyslíku, což se pravděpodobně podílí na poklesu relativních mobilit. Díky vysokému zápornému parciálnímu náboji na atomu dusíku mají na něj navázané atomy vodíku vysoký kladný parciální náboj, proto mohou velmi dobře tvořit vodíkové vazby. Se zvyšující se substitucí vysoce kladných vodíků methylovými skupinami klesá tvorba silných vodíkových vazeb a naopak se zvětšuje ta plocha markeru, která je nepolární, což způsobuje větší vypuzování tvrdých kationtů od molekuly. Součet všech těchto jevů způsobuje pokles relativních mobilit ve skupině krátkých amidů, jejichž srovnání je uvedeno v Obr. 4.4.



**Obr. 4.3** Elektroferogram pro DMFA v lithném pufru. DMFA je píka číslo 1, píky číslo 2 a 3 náleží thiomocovině.

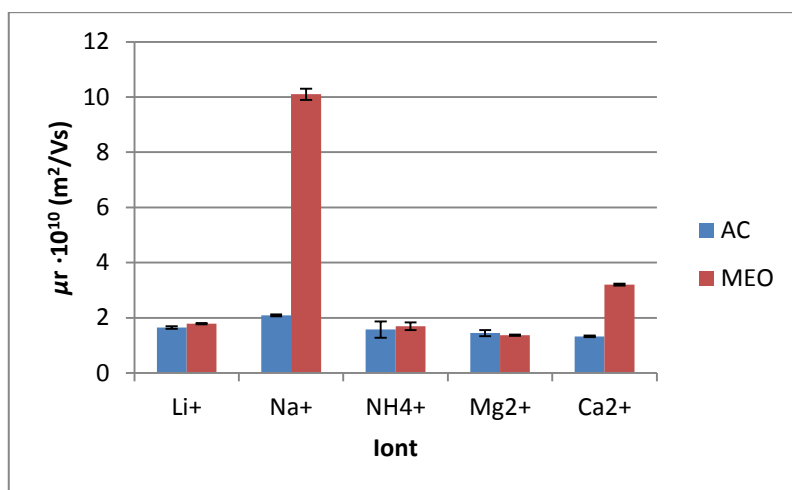
Obdobný trend je patrný při zvýšení stérického bránění záměnou vodíku za methylovou skupinu v N-methylacetamidu a vinylovou skupinu v akrylamidu. Relativní mobility obou těchto markerů jsou s výjimkou lithného kationtu nižší, než ty pro výše uvedenou řadu formamid – N-methylformamid – N,N-dimethylformamid. Tyto jevy (stérické bránění a poměr polární:nepolární část molekuly) se navzájem doplňují. Akrylamid pak vykazuje vyšší hodnoty relativních mobilit než N-methylacetamid, což zřejmě souvisí s přítomností dvojné vazby v akrylamidu. Na té je vyšší elektronová hustota než na samotné methylové skupině, což může částečně podpořit interakci a doplnit tak efekt atomu kyslíku. Dusíkový atom v akrylamidu má také vyšší záporný parciální náboj než dusík v N-methylacetamidu, což rovněž podporuje interakci s markerem.



**Obr. 4.4** Hodnoty relativních mobilit pro krátké amidy. Na grafu je názorně zobrazený vliv methylace amidického dusíku na schopnost markeru interagovat se základním elektrolytem. Nejvyšší relativní mobility vykazuje marker s nejsnáze přístupným vazebným místem, se zvyšující se methylací a tím i zvyšujícím se stérickým bráněním vazebného místa hodnoty relativních mobilit klesají.

K podobným strukturním změnám jako v předchozím případě dochází i ve dvojici markerů aceton – mesityl oxid, kde dochází k záměně methylové skupiny za skupinu isobutenovou. Až na sodný pufr jsou rozdíly mezi relativními mobilitami minimální, hodnoty relativních mobilit jsou vyšší pro mesityl oxid (Obr. 4.5). Tento jev opět pravděpodobně způsobila dvojná vazba na isobutenové skupině mesityl oxidu, která

navzdory vyššímu stérickému bránění od přítomných methylových skupin podporuje interakci. Až na výjimky pak aceton a mesityl oxid vykazují nižší hodnoty relativních mobilit než akrylamid a N-methylacetamid. Tento fakt pravděpodobně souvisí se záměnou amidové skupiny na centrálním uhlíku za methylovou. Díky tomu jsou jak kationty, tak acetát více vypuzovány od povrchu molekuly, což má za následek nižší mobilizaci markerů.

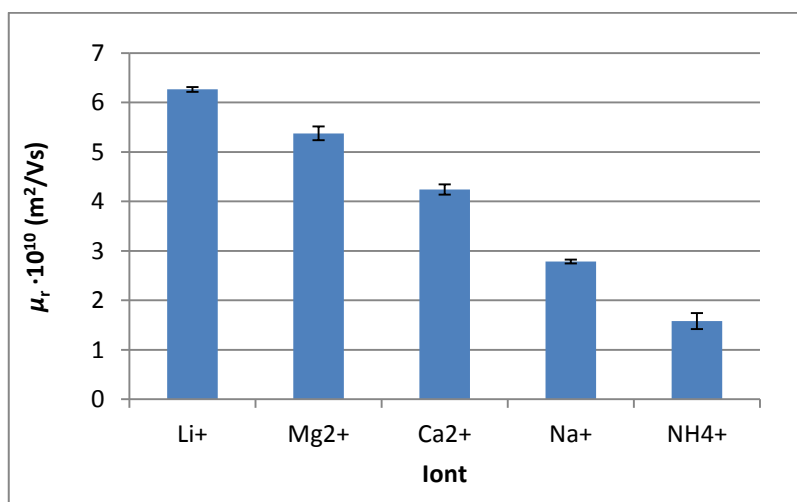


**Obr. 4.5** Hodnoty relativních mobilit pro aceton a mesityl oxid. V této dvojici markerů dochází ke strukturní změně na centrálním atomu uhlíku, kde se zaměňuje methylová skupina za isobutenovou. Tato změna nemá na velikost relativních mobilit příliš velký vliv s výjimkou sodného a vápenatého kationtu.

Naopak na dvojici thiomočovina – N-methylthiomočovina nemá methylace amidického dusíku žádný pozorovatelný vliv. To způsobuje pravděpodobně fakt, že síra, na které dochází k interakci v molekule thiomočoviny, má oproti kyslíku, na kterém k interakci dochází v jiných markerech, větší poloměr a tím pádem menší povrchovou hustotu náboje a s kationty se tak váže celkově slaběji. Další snížení záporného parciálního náboje, úbytek centra pro vodíkovou vazbu s acetátem a zvětšení nepolárního povrchu molekuly vůči polárnímu relativní mobilitu může ještě snížit, její hodnota však leží pod mezí pozorovatelnosti a není tak možné říct, jestli se od sebe relativní mobility thiomočoviny a N-thiomočoviny liší.

## 4.2 Vliv velikosti kationtu

Vzájemná interakce elektrolyt-marker nezávisí jen na vlastnostech markeru, ale též na vlastnostech elektrolytu. Mobilitu markerů přímo ovlivňují velikost kationtu a velikost jeho povrchového náboje. Čím větší je při stejném náboji daný kationt v použitém základním elektrolytu, tím nižší má povrchovou hustotu náboje, díky čemuž by mělo docházet k slabší interakci s polárními skupinami markeru ( $C=O$ ,  $S=O$ ). V molekule DMSO se nejvyšší záporný parciální náboj nachází na atomu kyslíku, který nese dva volné elektronové páry. Naproti tomu methylové skupiny jsou nepolární. Dimethylsulfoxid s kationtem elektrolytu reaguje interakcí dipól – iont právě na atomu kyslíku. V rámci period dochází ke zdvojnásobení velikosti povrchového náboje, takže je interakce silnější, přestože je kationt větší, jelikož nárůst poloměru není tak vysoký. Názorně je tato tendence ukázána v grafu porovnávajícím relativní mobility dimethylsulfoxidu v prostředí pěti různých kationtů (Obr. 4.6). Z grafu vyplývá, že relativní mobility DMSO klesají v obou skupinách ( $Li^+ > Na^+$ ;  $Mg^{2+} > Ca^{2+}$ ), ale pro 3. periodu rostou. Výsledné seřazení kationtů odpovídá míře jejich tvrdosti podle Hofmeisterovy řady.



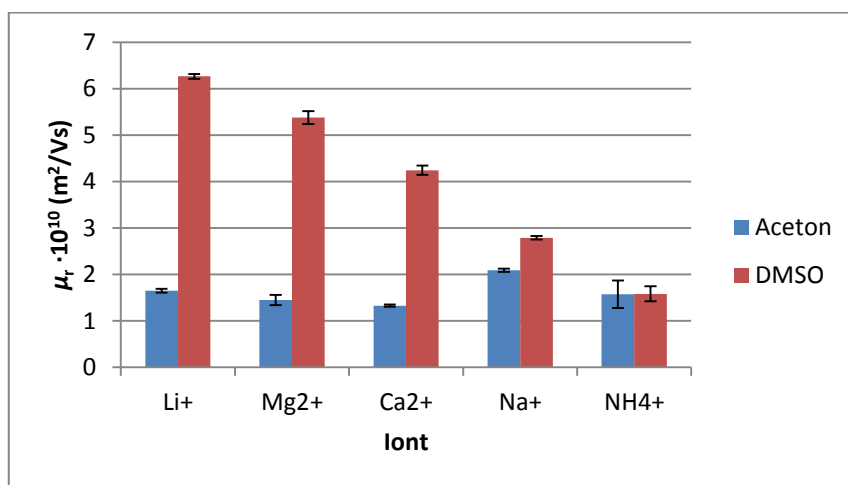
Obr. 4.6 Hodnoty relativních mobilit pro dimethylsulfoxid. Hodnoty relativních mobilit klesají pro kationty v pořadí jejich postavení v Hofmeisterově řadě.

### 4.3 Vliv velikosti centrálního atomu markeru

Rozdíl mezi molekulami acetonu a dimethylsulfoxidu spočívá v záměně centrálního atomu uhlíku za atom síry. Rozdíl v elektronegativitách je zde velmi malý. Uhlík však má výrazně menší kovalentní poloměr než síra (Tab. 4.3), což vzhledem k identické struktuře zbytku molekuly znamená, že aceton má výrazně větší plochu molekuly, která je nepolární, což snižuje možnost interakce s elektrolytem. Z geometrie molekuly dimethylsulfoxidu je patrné, že kyslík leží mimo rovinu zbytku molekuly a tak je pro vazbu s kationtem lépe přístupný, větší poloměr centrálního atomu navíc zvyšují vzdálenost atomu kyslíku od methylových skupin a stericke bránění methylovými skupinami je tak nižší než u acetonu. Hodnoty relativních mobilit jsou uvedeny v Obr. 4.7.

Tab. 4.3 Vybrané parametry atomů uhlíku a síry [29]

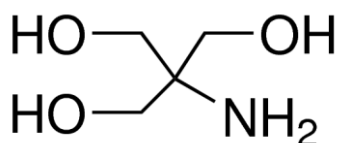
	Uhlík	Síra
<b>Elektronegativita (Pauling)</b>	2,55	2,58
<b>Atomový poloměr [pm]</b>	77,2	104



Obr. 4.7 Hodnoty relativních mobilit pro aceton a dimethylsulfoxid. Na této dvojici markerů je demonstrován vliv velikosti centrálního atomu markeru a tím i rozdílného rozvrstvení parciálního náboje na molekule a vedoucímu ke změnám ve vzájemné interakci. Mobility jsou zobrazeny v závislosti na kationtech seřazených podle jejich postavení v Hofmeisterově řadě.

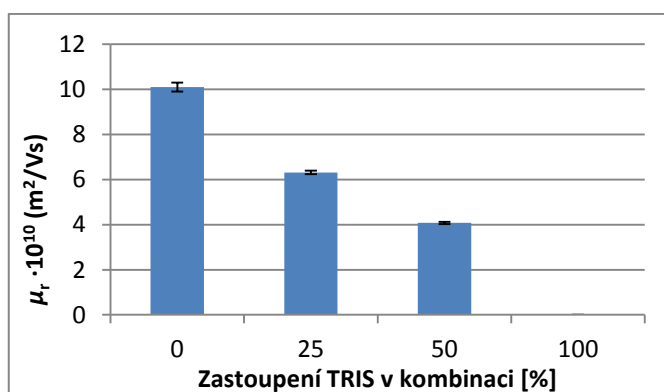
## 4.4 TRIS

V základním elektrolytu obsahujícím jako kationt TRIS nebyla relativní mobilita markerů měřitelná. Jedinou výjimkou byl N-methylacetamid, kde mobilita byla záporná. Tento odlišný trend relativních mobilit může být způsoben především výraznou strukturní odlišností TRIS od jednoduchých kationtů (Obr. 4.8). Ve struktuře TRISu se nachází tři hydroxyskupiny a jedna aminoskupina, díky kterým je tento kationt výrazně větší a navíc má možnost vytvářet složitější struktury vodíkových vazeb v porovnání s jednoduchými kationty.



Obr. 4.8 Struktura tris(hydroxymethyl)aminomethanu (TRIS)

Byl proveden pokus, kdy byl proměřen mesityl oxid ve směsi TRIS:Na<sup>+</sup> v různých poměrech. Mesityl oxid a sodné ionty byly vybrány, protože tato dvojice poskytla vůbec nejvyšší hodnotu relativní mobility pro marker a zkoumaný efekt tak byl lépe pozorovatelný. Bylo zjištěno, že efekty sodných iontů a TRIS jsou přibližně aditivní, což vylučuje výrazně odlišný mechanismus interakce markerů s tímto kationtem. Výsledky jsou ukázány v Obr. 4.9.



Obr. 4.9 Hodnoty relativních mobilit pro kombinaci sodných iontů a TRIS v acetátovém pufru v různých poměrech s mesityl oxidem jako markerem. Z obrázku vyplývá, že příspěvky obou kationtů k výsledné relativní mobilitě jsou přibližně aditivní, což ukazuje na obdobný mechanismus interakce, ačkoli je strukturní rozdíl mezi TRIS a velkými ionty značný.



## 4.5 Draselný kationt

Draselný kationt je v praxi velmi běžný, jelikož je levný a snadno dostupný v podobě rozličných sloučenin (hydroxid draselný, síran draselný, uhličitan draselný atd.). V počáteční fázi byla měření prováděna i s použitím octanu draselného jako možného pufru. Výsledky však ukázaly na naprostou nevhodnost použití draselného kationtu pro tento typ experimentu. V prostředí draselného kationtu bylo proměřeno několik markerů, ve všech případech však byla základní linie natolik nestabilní, že byla znemožněna identifikaci píků markerů. Vzhledem k vzájemné podobnosti draselných solí s amonnými dané především blízkými hodnotami poloměrů obou iontů se dá očekávat i podobnost relativních mobilit iontů v draselném a amonném pufru [27].

## 5. Závěr

Byly změřeny hodnoty relativních mobilit pro běžně používané markery elektroosmotického toku a jim strukturně blízké látky v acetátovém pufru v kombinaci s běžnými kationty. Na základě naměřených mobilit byly vytipovány dvojice marker – pufr, které je z hlediska interakcí markeru s kationtem základního elektrolytu vhodné používat, a kterým je naopak lepší se vyhnout. Mezi vhodné markery patří methanol a akrylamid v kombinaci s amonným kationtem. Naopak nevhodný je mesityl oxid v kombinaci se sodným kationtem, který vykazoval relativní mobilitu až 5 % hodnot mobilit pomalejších iontů, což je nejvyšší zjištěná hodnota vůbec. Nevhodné jsou též kombinace dimethylsulfoxidu a formamidu s jakýmkoli zkoumaným pufrem.

V rámci práce byly též zkoumány různé faktory, které mají vliv na sílu interakce markeru s pufrem. Na příkladu krátkých amidů je ukázán možný vliv zvyšující se methylace a tím pádem zvýšeného sterického bránění centra interakce. Tento vliv je dobře patrný na řadě formamid – N-methylformamid a N,N-dimethylformamid, kde dochází k výraznému poklesu relativních mobilit v rámci této řady pravděpodobně především vlivem sterického bránění centra interakce. V případě akrylamidu a N-methylacetamidu hraje roli v síle interakce záměna vodíku za větší organické skupiny, díky čemuž dochází ke změně poměru polární a nepolární části molekuly ve prospěch nepolární, a tím i oslabení vzájemné interakce s pufrem. To zřejmě způsobuje pokles relativních mobilit oproti formamidu. Akrylamid však interaguje s pufrem silněji, pravděpodobně díky přítomnosti dvojné vazby, která zde může figurovat jako další centrum interakce. Pro mesityl oxid a aceton, kde dochází k podobné strukturní změně, jsou rozdíly v relativních mobilitách minimální, vyšší hodnoty vykazuje mesityl oxid, v jehož isobutenové skupině je opět přítomna dvojná vazba podporující interakci. Naopak jejich relativní mobility jsou nižší než pro amidy, což pravděpodobně souvisí se záměnou amidové skupiny za methylovou, která acetát i kationty více vypuzuje od povrchu molekuly a mobilizace markerů je tak nižší.

Vliv záměny centrálního iontu uhlíku acetonu za síru dimethylsulfoxidu má za následek pokles relativních mobilit pro aceton způsobený pravděpodobně poklesem povrchu polární části molekuly díky rozdílným poloměrům obou atomů, jelikož rozdíl

v elektronegativitách je zanedbatelný, a také změnou v celkové geometrii molekuly. Kyslík v dimethylsulfoxidu je díky své poloze mimo rovinu molekuly lépe přístupný pro interakci než kyslík v molekule acetonu.

V míře interakce hrají roli i vlastnosti kationtu, konkrétně jeho velikost a náboj. Pro demonstrování vlivu těchto faktorů byl vybrán dimethylsulfoxid, pro který je patrný trend klesání relativní mobility ve skupině směrem dolů s rostoucím iontovým poloměrem a tím nižší hustotou povrchového náboje. Naopak v periodách, kde dochází ke zdvojnásobení povrchového náboje, relativní mobility dimethylsulfoxidu rostou.

V TRIS nevykazují markery s výjimkou NMA měřitelnou hodnotu relativní mobility. Takto nízká interakce s markery je pravděpodobně způsobena odlišnou strukturou a velikostí kationtu TRIS. Experimentálně bylo zjištěno, že příspěvek TRIS a jiných kationtů k mobilizaci markerů je aditivní, takže mechanismus interakce se pravděpodobně neliší od mechanismu interakce s ostatními kationty.

Neměřitelnou relativní mobilitu vykazuje též N-methylthiomočovina. Spolu s thiomočovinou se tak jeví jako vhodné markery elektroosmotického toku. Předpoklad, že je absolutní mobilita thimočoviny velmi nízká, podporuje neměřitelná změna mezi thiomočovinou a N-methylthiomočovinou. Vzhledem k tomu, že v ostatních případech má methylace na hodnotu relativní mobility markeru významný vliv, dal by se obdobný výsledek předpokládat i pro tuto dvojici v případě, že by relativní mobility dosahovaly hodnot měřitelných.

## Použitá literatura

- [1] Kielland, J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 59 (1937), 1675-1678.
- [2] Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M.: *J. Sep. Sci.*, 26 (2003), 653-660.
- [3] He, J.-F., Yang, W.-Y., Yao, F.-J., Zhao, H., Li, X.-J., Yuan, Z.-B.: *J. Chromatography A*, 1218 (2011), 3816-3821.
- [4] Wilson, W. H., McNair, H. M.: *J. Chromatography*, 540 (1991), 77-83.
- [5] Salomon, K., Burgi, D. S.: *J. Chromatography*, 559 (1991), 69-77.
- [6] Wallingford, R. A., Ewing, A. G.: *Advances in Chromatography*, 29 (1989), 1-76.
- [7] Kašička, V.: *Chem. listy*, 91 (1997), 320-329.
- [8] Guan, F., Wu, H., Luo, Y.: *J. Chromatography A*, 719 (1996), 427-433.
- [9] Fukushi, K., Takeda, S., Chayama, K., Wakida, S.-I.: *J. Chromatography A*, 834 (1999), 349-362.
- [10] Martínez, V., García, N., Antigüeda, I., Alonso, R. M., Jiménez, R. M.: *J. Chromatography A*, 1032 (2004), 237-242.
- [11] Boudko, D. Y., Cooper, B. Y., Harvey, W. R., Moroz, L. L.: *J. Chromatography B*, 774 (2002), 97-104.
- [12] Gallardo, B. S., Gupta, V. K., Eagerton, F. D., Jong, L. I., Craig, V. S., Shah, R. R., Abbott, N. L.: *Science*, 283 (1999), 57-60.
- [13] Milanova, D., Chambers, R. D., Bahga, S. S., Santiago, J. G.: *Electrophoresis*, 32 (2011), 3286-3294.
- [14] Parker, K. M., Stalcup, A. M.: *J. Chromatography A*, 1204 (2008), 171-182.

- [15] Sieman, A., Vaher, M., Kaljurand, M.: *J. Chromatography A*, 1189 (2008), 266-273.
- [16] Jimppanen, J. H., Riekkola, M.-L.: *Anal. Chem.*, 67 (1995), 1060-1066.
- [17] Ermakov, S. V., Capelli, L., Righetti, P. G.: *J. Chromatography A*, 744 (1996), 55-61.
- [18] Altria, K. D., Simpson, C. F.: *Chromatographia*, 24 (1987), 527-532.
- [19] Kuhr, W. G., Licklider, L., Amankwa, L.: *Anal. Chem.*, 65 (1993), 277-282.
- [20] Taylor, J. A., Yeung, E. S.: *Anal. Chem.*, 65 (1993), 2928-2932.
- [21] Lee, T. T., Dadoo, R., Zare, R. N.: *Anal. Chem.*, 66 (1994), 2694-2700.
- [22] Kunz, W.: *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15 (2010), 34-39.
- [23] Křížek, T., Kubičková, A., Hladílková, J., Coufal, P., Heyda, J., Jungwirth, P.: *Electrophoresis*, 35 (2014), 617-624.
- [24] Ušelová-Včeláková, K.; Zusková, I.; Gaš, B.: *Electrophoresis*, 28 (2007), 2145-2152.
- [25] William, B. A.; Vight, G. Fast: *Anal. Chem.*, 68 (1996), 1174-1180.
- [26] Wernersson, E.; Heyda, J.; Kubičková, A.; Křížek, T.; Coufal, P.; Jungwirth, P.: *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010), 11934-11941.
- [27] Pauling, L. *College Chemistry*. 2<sup>nd</sup> edition. San Francisco: W. H. Freeman and Company. 1957.
- [28] Atkins, P., Paula, J. de. *Physical chemistry*. 8<sup>th</sup> edition. New York: W. H. Freeman and Company. 0-7167-8759-8.
- [29] Štulík, K., Vohlídal, J., Julák, A. *Chemické a analytické tabulky*. 1. vydání. Praha: Grada. 1999. ISBN 978-80-7169-855-5.
- [30] *Swiss Laboratory for Doping Analyses* [online]. 9. 9. 2011 [cit. 25. 11. 2011]. Dostupné z World Wide Web: <<http://www.doping.chuv.ch/>>

[31] *Biochemical web* [online]. 29. 1. 2044 [cit. 20. 4. 2015]. Dostupné z World Wide Web: <<http://biochemie.sweb.cz/>>

[32] *Capillary Zone Electrophoresis* [online] 24. 1. 1996 [cit.] 14. 5. 2015. Dostupné z World Wide Web: <<https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>>